ARTIGO DE REVISÃO

Diagnóstico laboratorial da tuberculose: Revisão de literatura

Laboratory diagnosis of tuberculosis: literature review

Ronaldo Rodrigues da Costa[1,*], Marcio Roberto Silva[2], Isabel Cristina Gonçalves[3]

RESUMO

A tuberculose (TB) caracteriza-se por ser uma doença infecciosa, transmissível de pessoa a pessoa por via aérea, principalmente. A forma pulmonar é a mais frequente e tem como principal agente causador o *Mycobacterium tuberculosis*. Oitenta e quatro por cento da carga mundial de TB está concentrada em 20 países, incluindo o Brasil. Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou uma estratégia com metas de erradicação da epidemia da TB em nível mundial até 2035. Porém, um dos principais fatores que dificulta o controle da doença é a demora no diagnóstico, que por sua vez, aumenta o tempo de exposição das pessoas ao bacilo da TB, o que contribui para agravar todo o processo de transmissão e adoecimento, com elevação do número de casos novos da doença. Ressalta-se que a TB apesar de ser conhecida e tratável há muitos anos, continua sendo um grande problema de saúde pública mundial exigindo complementação de estratégias para o seu controle. Este estudo apresenta uma revisão de literatura com ênfase para os diagnóstico laboratorial da tuberculose, fazendo uma abordagem mais detalhada dos exames bacteriológicos. Dentre estes, os métodos de preparação da amostra (descontaminação, purificação) e cultivo em meios sólidos terão uma atenção especial, com foco nas vantagens e desvantagens de cada método.

Palavras-chave: Tuberculose; Diagnóstico; *Mycobacterium tuberculosis.*

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is characterized by an infectious disease, transmissible from the person by air, mainly. The pulmonary form is more frequent and has the main causative agent of Mycobacterium tuberculosis. Eighty-four percent of the world's TB burden is concentrated in 20 countries, including Brazil. In 2014, the World Health Organization (WHO) announced a strategy with global TB eradication targets by 2035. However, one of the main factors that makes it difficult to control the disease is the delay in diagnosis, which in turn increases the exposure time of people to the TB bacillus, which contributes to aggravate the entire process of transmission and illness, of the number of new cases of the disease. It is noteworthy that TB, despite being known and treatable for many years, remains a major global public health problem requiring the complementation of strategies for its control. This study presents a review of the literature with emphasis on the laboratory diagnosis of tuberculosis, taking a more detailed approach to bacteriological examinations. Among these, the methods of sample preparation (decontamination, purification) and culture in solid media will pay special attention, focusing on the advantages and disadvantages of each method.

Keywords: *Tuberculosis; Diagnosis; Mycobacterium tuberculosis.*

1. Farmacêutico-bioquímico. Doutor em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora. Pesquisador do Hospital Regional João Penido/HRJP. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais/FHEMIG. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.
2. Médico Veterinário. Doutor em Saúde Pública, pesquisador da Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG, Brasil.
3. Odontóloga. Doutora em Saúde Pública, Professora pesquisadora da UFJF, Bolsista de Produtividade em Pesquisa CNPq. UFJF. Juiz de Fora, MG – Brasil.

*** Autor correspondente:** Hospital Regional João Penido/FHEMIG e Hospital Universitário/UFJF
E-mail: ronaldorodriguesdacosta5@gmail.com

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) caracteriza-se por ser uma doença infecciosa, transmissível de pessoa a pessoa. A forma pulmonar é a mais frequente e tem como principal agente causador o *Mycobacterium tuberculosis*.[1] Vários fatores estão associados a esta patologia, dentre eles infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diabetes, desnutrição, alcoolismo crônico, drogadição e uso de fármacos imunossupressores. Em indivíduos infectados pelo bacilo, o HIV é o maior fator de risco para o desenvolvimento da forma ativa da doença.[2,3]A cada ano, cerca de um por cento da população mundial se torna infectada pelo bacilo da TB, um caso novo a cada segundo. Uma em cada três pessoas no mundo tem tuberculose latente, ou seja, estão infectadas, mas nem todos desenvolverão a forma ativa da doença. O número de casos novos no mundo em 2016 foi de aproximadamente 10,4 milhões (1,0 milhão coinfectados pelo HIV, 0,8 milhão de tabagistas e 0,8 milhão de diabéticos). Neste mesmo ano, cerca de 1,3 milhões de pessoas morreram desta doença, incluindo mais de 926 mil mortes de pacientes HIV negativos e 374 mil de pacientes HIV positivos. A maioria desses casos (57%) concentra-se no sudeste asiático e região ocidental do pacífico. O continente africano teve em 2016, 25% do total mundial de casos e a carga mais grave em relação à população (254 casos novos por 100.000 habitantes (hab), quase o dobro da média global que é de 140).

No entanto, a TB, apesar de ser uma doença conhecida e tratável há muitos anos, continua sendo um grande problema de saúde pública mundial exigindo complementação de estratégias para seu controle.[4,5,6]

A incidência em Juiz de Fora é bastante elevada, talvez pela falta de ações efetivas para o controle da doença no município, em comparação com o encontrado em Minas Gerais (20,48/100.000), estado que ocupa a 24ª colocação no Brasil, o que também é observado quando comparado com a média nacional (38,3/100.000), conforme apontam Lima (2013);[7] Pereira et al. (2015)[5] e Silva et al. (2013).[8]

A OMS estabeleceu como meta para 2015, detectar pelo menos 70% dos casos novos de TB e curar pelo menos 85% deles.

Para 2035 a meta da OMS é reduzir o coeficiente de incidência para menos de 10 casos por 100 mil hab.[3]

Porém, um dos principais fatores que dificulta o controle da doença é a demora no diagnóstico, que por sua vez, aumenta o tempo de exposição das pessoas ao bacilo da tuberculose, com o agravamento de todo o processo de transmissão e adoecimento e elevação do número de casos novos da doença.[9]

Este estudo apresenta uma revisão de literatura com ênfase para o diagnóstico laboratorial da tuberculose, fazendo uma abordagem mais detalhada dos exames bacteriológicos.Dentre estes, os métodos de preparação da amostra (descontaminação, purificação) e cultivo em meios sólidos terão uma atenção especial, com foco nas vantagens e desvantagens de cada método.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BACILOSCOPIA

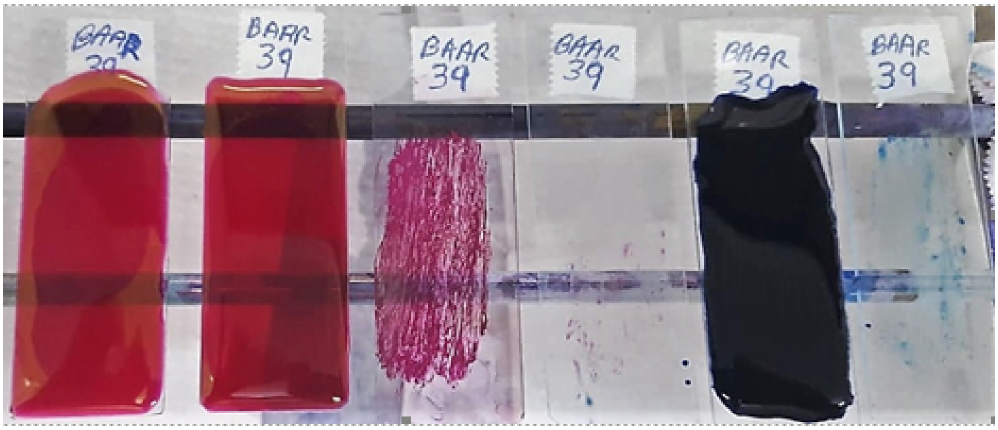
A pesquisa bacteriológica é um método de importância fundamental em adultos, tanto para o diagnóstico quanto para o controle de tratamento. Existem vários métodos de coloração empregados para o diagnóstico da TB, entre eles método de Ziehl Neelsen (ZN), (Figuras 1 e 2). O método Kinyon que é uma variante do ZN e difere do método original pela exclusão da etapa de aquecimento e a coloração fluorescente com auramina. Essa última é recomendada para laboratórios que façam mais de 100 lâminas por dia. Porém, além de exigir pessoal treinado, todas as lâminas com baciloscopias positivas desse método devem ser confirmadas pela coloração de ZN.[10]

A baciloscopia constitui na técnica de identificação mais utilizada no mundo, por ser rápida e barata, após coloração específica que permite visualização do bacilo e permite detectar 60% a 80% dos casos de TB pulmonar.[11] Deve ser realizada em no mínimo duas amostras coletadas em dias diferentes, sendo uma no momento da consulta e outra no dia seguinte, preferencialmente ao despertar, independentemente do resultado da primeira amostra.[10] Porém, este método apresenta baixa sensibilidade e especificidade, sendo necessários de 5.000 a 10.000 bacilos por ml para que o teste seja positivo, sendo descrita numa faixa de sensibilidade de 25% a 65% quando comparada com a cultura.[1,12,13,14,11]

Etapas:

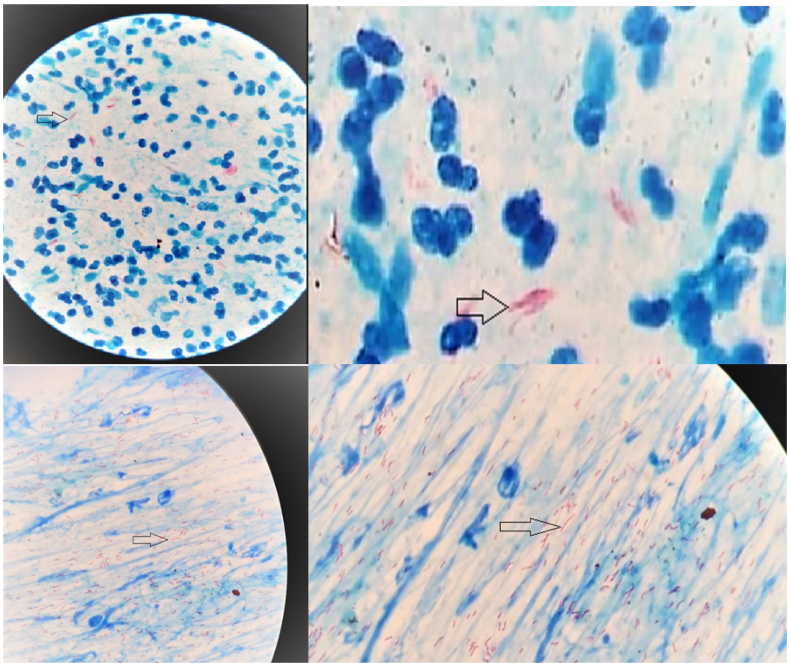
1. adiciona-se a fucsina sobre o esfregaço previamente fixado;
2. faz-se o aquecimento até a emissão de vapores, por 3 vezes, para facilitar a penetração da fucsina;
3. derrama-se o corante em descarte apropriado e lava-se o esfregaço com água;
4. faz-se a descoloração com álcool-ácido e lava-se o esfregaço com água. Apenas os BAAR presentes no esfregaço reterão a fucsina;
5. adiciona-se azul de metileno;
6. lava-se o esfregaço com água e faz-se a leitura microscópio óptico em objetiva 100x. Fonte: CAMPELO et al., 2001 [15]

FIGURA 1. Representação esquemática das etapas da coloração pelo método de ZN.



Fonte: Foto cedida por Luiz Henrique Castro Cunha.

FIGURA 2. Imagem de microscopia óptica de lâmina de "escarro" corada pela coloração de ZN... no aumento de 100x.



Fonte: O próprio autor, 2017.

BAAR: bacilo álcool ácido resistente.

Para a análise da baciloscopia de escarro o resultado deve ser interpretado conforme a quantidade de bacilos presentes como mostra o Quadro 1, abaixo.

CULTURA PARA MICOBACTÉRIA

É um método de detecção de elevada especificidade e sensibilidade. Em casos de baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% a positividade e é considerada padrão ouro para o diagnóstico da TB.[11,16,17,18] O limite de detecção de bacilos desse método é de 100 bacilos por mililitro (mL) de escarro, mas quando realizada com alta qualidade técnica, é capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mL de escarro.[11,19] Os meios sólidos a base de ovo, LJ e O-K, são os mais utilizados para o cultivo das micobactérias. Ambos apresentam a vantagem do baixo custo e de apresentarem menor índice de contaminação, porém apresentam como desvantagem o tempo de crescimento que varia de 15 a 30 dias, podendo chegar até oito semanas.[20, 21,22] Além dos

QUADRO 1. Interpretação do resultado da baciloscopia de escarro segundo número de bacilos observados.

Resultado obtido	Laudo emitido
Não encontrar BAAR em 100 campos	NEGATIVO
de 1 a 9 BAAR em 100 campos	Número de BAAR encontrado
de 10 a 99 BAAR em 100 campos	POSITIVO (+)
de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos	POSITIVO (++)
mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos	POSITIVO (+++)

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2001.

métodos que utilizam meio de cultivos sólidos existem os métodos que utilizam meios de cultivos líquidos com resultados disponíveis após 5 a 13 dias.[10,23]

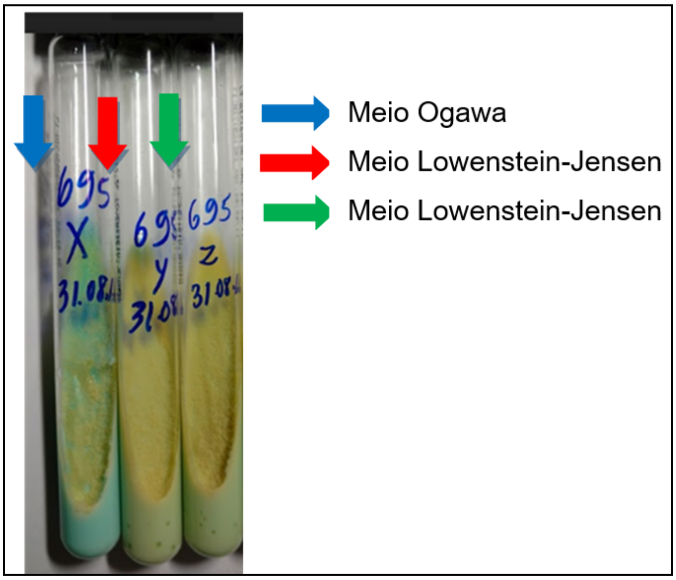
A cultura em meio líquido também pode ser utilizada, empregando sistemas automatizados não radiométricos e com monitoração contínua. Esta é recomendada para laboratórios que recebem um grande volume de amostras clínicas, como hospitais e Laboratórios de Referência.[23]

As colônias crescidas, em meios sólidos, devem ser analisadas microscopicamente e macroscopicamente para confirmação (Figuras 3 e 4). A análise macroscópica é realizada na cultura original, onde são observadas colônias que apresentam diferentes morfologias e pigmentação, podendo ser lisa, rugosa, opaca ou transparente. Já a análise microscópica, consiste na confecção de um esfregaço em lâmina a partir de uma colônia, corado pelo método de ZN. Assim é possível analisar a pureza da cultura e confirmar a presença de BAAR. Geralmente, as micobactérias apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos, enquanto as espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam um arranjo característico dos bacilos em cadeias lineares paralelas (ou cordões de bacilos) denominado corda (Figura 4). A maioria das Micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) não forma corda, apresentando aspecto microscópico de bacilos. A identificação da espécie é realizada por métodos bioquímicos e fenotípicos ou por técnicas moleculares.[4,18,24]

Independentemente do resultado da baciloscopia, a cultura e o TS deverão ser indicados nos casos de contatos de TB resistente, pacientes com antecedentes de tratamento prévio para TB, pacientes imunodeprimidos e/ou com baciloscopia positiva no final do segundo mês de tratamento, falência ao tratamento, em investigação de populações com maior risco de adquirirem cepa de *M. tuberculosis* resistente.[11,17]

O Ministério da Saúde estabeleceu como meta, para 2015, a realização de cultura em pelo menos uma amostra de cada paciente sintomático respiratório.[17,25]

FIGURA 3. Característica macroscópica das colônias *Mycobacterium tuberculosis* crescidas nos meios de cultivo O-K e LJ.



Fonte: Foto do próprio autor, 2016

Legenda: X = *Ogawa*.

Y = *Petroff*.

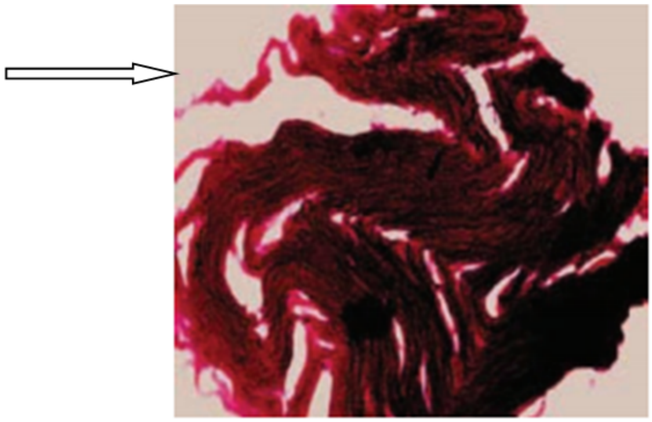
Z = RR-TB.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E CULTURA DE MICOBACTÉRIAS

As amostras do trato respiratório inferior, além de apresentarem células epiteliais e polimorfonucleares, rotineiramente, apresentam microbiota bacteriana associada. Por isso, quando se realiza cultura para o diagnóstico da TB pulmonar é importante eliminar a microbiota associada, pois esta tem crescimento mais rápido, contamina o meio de cultura, impede que as micobactérias cresçam e sejam identificadas, dificultando o diagnóstico da doença.[18]

Com o propósito de viabilizar o cultivo das micobactérias e possibilitar sua identificação, é

FIGURA 4. Aspectos do *Mycobacterium tuberculosis* em esfregaços corados pela técnica de Zielh-Nelsen, no aumento de 100x, mostrando o efeito corda.



Fonte: foto de Gleize Villela.

fundamental que as bactérias presentes na amostra sejam eliminadas. Para isso todo material biológico potencialmente com microbiota associada presente, deve ser submetido ao processo de descontaminação, ou seja, purificação da amostra antes da semeadura em meios específicos.[18]

Os principais métodos de preparação e cultivo de micobactérias são constituídos por 5 etapas: pré-tratamento, fluidificação e descontaminação, semeadora, incubação e leitura do resultado.[18]

A etapa de fluidificação e descontaminação é realizada utilizando agentes químicos (ácidos ou bases) para homogeneizar a amostra clínica e eliminar outros microrganismos, porém, preservando as micobactérias que são liberadas do muco e da fibrina (fluidificando o escarro) ou dos tecidos em que estão incluídos. A eliminação desses microrganismos proporciona o crescimento das micobactérias sem a competição pelos nutrientes contidos nos meios de cultura. Essa etapa é realizada apenas nas amostras contaminadas por microbiota associada ou ambiental.

São exemplos de agentes fluidificantes: hidróxido de sódio (NaOH), N-acetil-L-cisteína (NALC) e ácido oxálico. A semeadura em meio de cultura proporciona o contato das micobactérias existentes na amostra com as substâncias nutritivas dos meios de cultivo, sendo utilizados com mais frequência, os meios à base de ovos, como o LJ e O-K.

A fase de incubação fornece a temperatura que varia entre 35ºC e 37ºC, ideal e necessária para a multiplicação das micobactérias, como as do Complexo *Micobaterium Tuberculosis* (CMTB).

Finalmente, na leitura dos tubos semeados e registro dos resultados, verifica-se a presença de colônias e/ou de contaminação, como sinal de presença de micobactérias e registra-se sua ocorrência.[18,22]

PRINCIPAIS MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

Existem vários métodos de preparação de amostras, tais como: NaOH 4% (Petroff), padrão ouro mundialmente conhecido,[26] N-acetil-L-cisteina/NaOH 2% (p/v) (NaLC-NaOH), lauril sulfato de sódio,[18] NaOH 4% (p/v) (*Swab*)[21,22] e Darzins,[27] o qual utiliza uma solução precipitadora que facilita a sedimentação e concentração dos bacilos, além de aumentar a sensibilidade do método.

Os métodos NaLC-NaOH e o lauril sulfato de sódio podem ser usados para vários tipos de amostras clínicas (lavado brocoalveolar, secreção traqueal, lavado gástrico, fezes e urina), porém, são trabalhosos e exigem centrifugação de 30 minutos, além de necessitarem de cabine de segurança biológica e pessoal tecnicamente qualificado para o processamento da amostra.[18,22]

O método de Darzins (Figura 5) também pode ser utilizado para vários tipos de amostras clínicas (lavado brocoalveolar, secreção traqueal, lavado gástrico, fezes e urina). Consiste na purificação da amostra, utilizando uma solução alcalina, agitação, centrifugação após acréscimo de uma solução precipitadora para facilitar o processo da sedimentação e, por fim, neutralização do sedimento com uma solução ácida antes da semeadura. Este método depende de equipamentos para agitação e centrifugação além de profissional tecnicamente qualificado.[27,28]

O método de *Petroff* modificado (Figura 6) utiliza solução de NaOH a 4% p/v como agente de fluidificação-descontaminação, em igual volume do escarro, com concentração final de NaOH 2%. Tem como ponto positivo a possibilidade de utilização de meios de cultura com PNB e TCH que permitem fazer a identificação presuntiva de *M. tuberculosis* em cultura primária, com ganho de 30 dias no tempo de diagnóstico. Porém, esta técnica necessita de centrifugação refrigerada, neutralização e de cabine de segurança biológica, fato que torna a técnica mais dispendiosa e inviável para muitos laboratórios.[18,26]

NaOH 4% (*Swab*) é o método de O-K (Figura 7), criado em 1974 por Kudoh & Kudoh. Os autores propuseram uma técnica simplificada para descontaminação de amostras de escarro, que utiliza o *swab* de algodão e tem como agente descontaminante o NaOH a 4%, cuja semeadura ocorre diretamente em meio de cultura *Ogawa*. [21] Leva-se apenas 3-4 minutos por amostra, não necessita de técnicos qualificados, não utiliza etapa de centrifugação e dispensa o uso de cabine de segurança biológica.

FIGURA 5. Fluxograma do Método de Darzins.

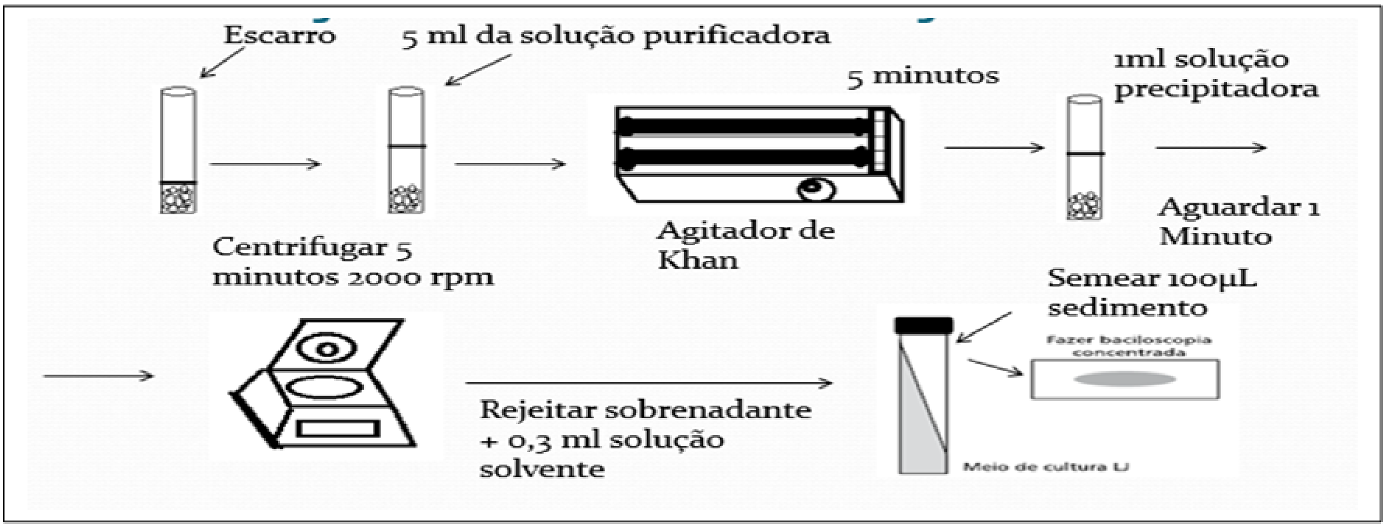
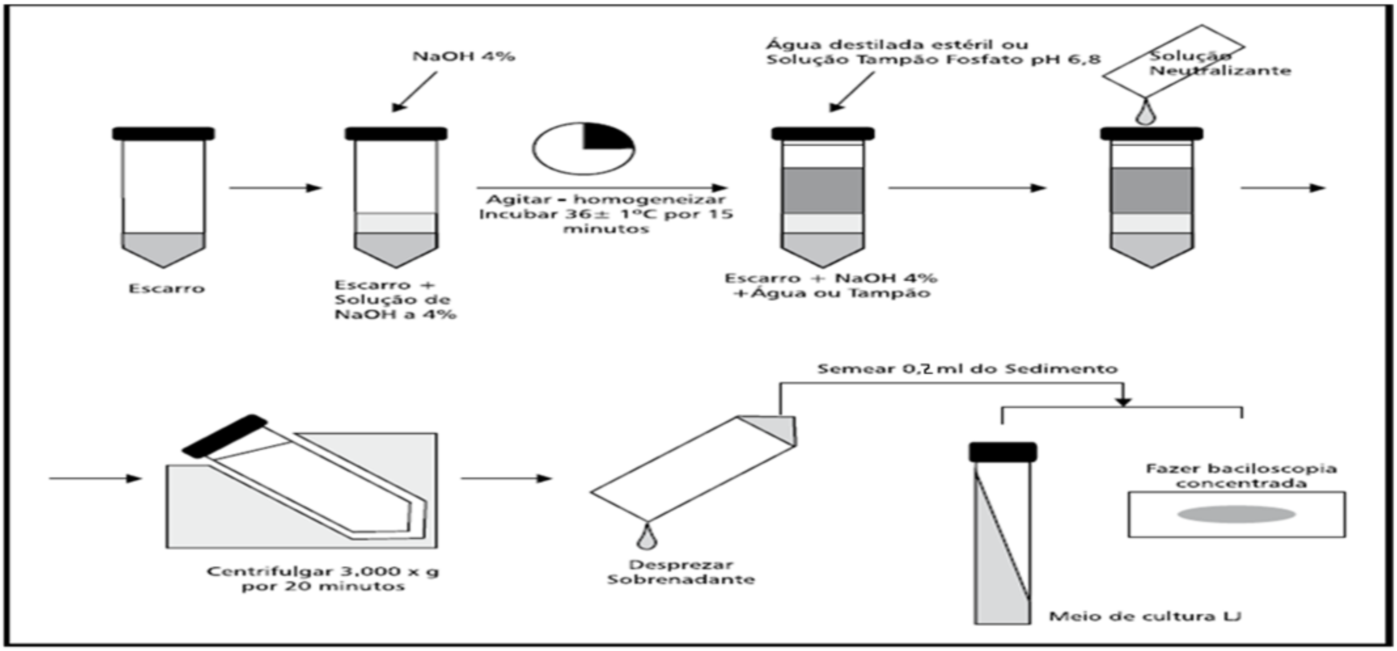


FIGURA 6. Fluxograma do Método de Petroff.



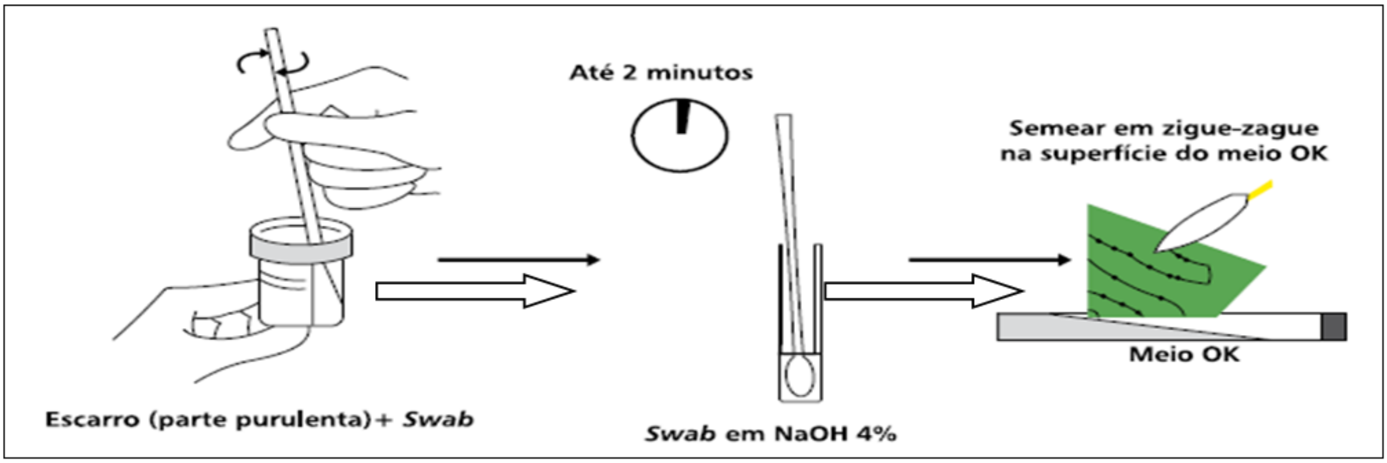
Fonte: BRASIL, 2008[29].

Constitui numa técnica simples, sensível e de baixo custo, acessível a qualquer laboratório. [30] Porém, para substituir a etapa de neutralização, a técnica de Ogawa necessita de meio de cultura com pH ligeiramente ácido. Este meio de cultura, devido ao seu pH ácido, dificulta o crescimento das micobactérias não sendo recomendada sua utilização para cultura de amostras estéreis como: líquor, líquido acítico, líquido pleural, entre outros. Portanto, este método é indicado apenas para amostras de escarro.[21,22]

Os métodos de descontaminação apresentam um mesmo objetivo, porém possuem diferenças na realização da técnica, quanto: ao tempo necessário para o processamento, custo da metodologia, equipamento utilizado, sensibilidade e exposição do manipulador durante o procedimento, como sintetizado no Quadro 2.

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o meio de LJ, um meio solidificado à base de ovo que contém glicerol e asparagina como fontes de

FIGURA 7. Esquema da técnica de descontaminação Ogawa-Kudoh.



Fonte: BRASIL, 2008[30].

QUADRO 2. Características dos principais métodos de descontaminação de amostras empregados no diagnóstico da tuberculose.

Método / Itens necessários	Petroff	Ogawa-Kudoh	Darzins	NaLC-NaOH	Lauril
Câmara de segurança biológica	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Centrifugação	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Centrifuga refrigerada	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Centrífuga comum	Não	Não	Sim	Não	Não
Agitação	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Meio de cultura LJ	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Meio de cultura Ogawa	Não	Sim	Não	Não	Não
Permite o processamento de escarro	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Permite processamento de secreção traqueal, lavado broncoalveolar e pericárdico	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Etapa de alcalinização (descontaminação)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Etapa de neutralização do Ph	Sim	Não	Sim	Sim	Aim
Pessoal especializado	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Risco	Alto	Baixo	Alto	Alto	Alto
Tempo total para realização da técnica	40 a 60 minutos	2 a 3 minutos	20 a 30 minutos	40 a 60 minutos	40 a 60 minutos
Custo	Alto	Baixo	Médio	Alto	Alto

Fonte: próprio autor.

carbono e nitrogênio, respectivamente. Este meio permite o crescimento da maioria das espécies micobacterianas de interesse médico.[18,22]

Já o meio de O-K é a base do LJ com a troca da asparagina por glutamato de sódio e o pH final é de aproximadamente 6,4.[21] Se por um lado a acidez do meio O-K elimina a fase de neutralização da amostra, por outro lado, a utilização deste meio de cultura está recomendado apenas às amostras de escarro, além de não permitir sua utilização para o teste de sensibilidade aos fármacos.

COMENTÁRIOS

Embora existam várias metodologias para o diagnóstico da doença, o combate à tuberculose constitui ainda em um grande desafio no que se refere ao oferecimento de tecnologias em saúde pública de forma ampla e contundente. Dependendo de suas características e particularidades, cada metodologia tradicional tem suas limitações, seja pelo custo, seja pela necessidade de profissionais especializados, por permitir sua utilização apenas em amostras de escarro ou por questões de biossegurança. Nesse contexto, a inserção de novas técnicas se faz necessária para que os serviços de saúde contemplem um número maior de pessoas, ampliando o acesso aos serviços de saúde.

Apesar dos avanços no diagnóstico da doença, com a inclusão do teste rápido molecular como rotina, que permite identificação apenas de *M. tuberculosis*, os exames de baciloscopia e cultura continuam como padrão ouro para monitoramento do tratamento e em situações de retratamento, que demandam conhecer o perfil de resistência aos medicamentos, e a escolha do tratamento mais adequado.

Em países em desenvolvimento o uso de tecnologias de ponta é limitado e o combate às doenças como a tuberculose ainda é desafiador. Na contramão do enfrentamento às doenças negligenciadas, o acesso limitado agrava o problema e coloca a saúde pública em patamares que não contemplam o que se espera como redução de custos na abordagem diagnóstico e terapêutica e ganhos na qualidade de vida para as pessoas acometidas pela doença.

Assim, o desenvolvimento e/ou uso de metodologias mais simples, de menor custo e igual sensibilidade na etapa de descontaminação das amostras para posterior semeadura, aumentaria a possibilidade de realização de cultivos na rotina laboratorial de diferentes regiões, possibilitando maior cobertura diagnóstica, abreviando o tempo de transmissão da doença, favorecendo o combate à TB.

Embora os indicadores mostrem uma leve queda na incidência da doença, a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública e seu combate está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce.

CONCLUSÃO

A busca ativa de sintomático respiratório é a principal estratégia para o controle da TB, pois permite a detecção precoce das formas pulmonares e tem como importante ferramenta, a cultura do espécime clínico.

Embora os métodos de *Petroff* e de *Darzins* têm a vantagem de permitir cultura de escarro e de outros materiais como lavados, aspirados e fluidos corporais, estes, necessitam de estrutura com cabine de segurança biológica, centrífuga e pessoal tecnicamente qualificado para o processamento das amostras. Por outro lado, o *Ogawa* é uma técnica mais simples, fácil de fazer e oferece menos riscos para o operador, porém, é recomendada apenas para amostras de escarro. Neste caso, exige que o laboratório disponha de duas técnicas de descontaminação para trabalhar com qualquer tipo de amostra.

É importante a realização de estudos que visem elaborar e apresentar novos métodos e processos de cultivo de micobactérias, contribuindo para o incremento no diagnóstico da doença, interrompendo a cadeia de transmissão, com redução do número de novos casos e os casos de complicações que levam a internações, que favorece o controle da TB.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Gerência de Ensino e Pesquisa da FHEMIG, sob o parecer de número 01/2014 e Comitê de ética da FHEMIG sob o parecer de número 816.628 de 02 de outubro de 2014.

O projeto foi submetido ao CRITT (UFJF) e ao NIT (FHEMIG) para análise e posterior depósito de patente.

REFERÊNCIAS

1. Paiva VS, Pereira M, Moreira JS. Perfil epidemiológico da tuberculose pulmonar em Unidade Sanitária de referência em Porto Alegre, RS. Rev Assoc Med Rio Gd do Sul. 2011; 55(2):113-7.

2. Andrade ET, et al. Perspectives of Patients, doctors and medical students at a public University Hospital in Rio de Janeiro regarding tuberculosis and therapeutic adherence. PLoS One. 2015; 10(9) e0137572.

3. WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva, Switzerland: World Health Organization, WHO Press; 2017.

4. Kadioglu EE, et al. A comparison of two different culture methods for use in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Eur J Med. 2014; 46(2):74.

5. Pereira JDC, et al. Profile and follow-up of patients with tuberculosis in a priority city in Brazil. Rev Saúde Pub. 2015; 49: 1-12.

6. Rodrigues HAN. Doenças negligenciadas no estado de Roraima: uma análise a partir da geografia da saúde para o período de 2000 a 2013 [dissertação]. (Mestrado em ambiente e desenvolvimento) – Programa de Pós-graduação em Ambiente e Desenvolvimento do Centro Universitário da Universidade do Vale do Taquari, Lageado; 2015.

7. Lima MDFF. O contexto socioambiental da tuberculose pulmonar em Juiz de Fora (MG); 2013.

8. Silva MR, et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(3): 321-7.

9. Alavi SM, Bakhtiyariniya P, Albagi A. Factors associated with delay in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(3).

10. Castelo Filho A, et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose 2004. J Bras Pneumol. 2004; 30:S57-S86.

11. WHO. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization, WHO Press; 2015.

12. Muwonge A, et al. A comparison of tools used for tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: a case study at Mubende Referral Hospital, Uganda; 2014.

13. Silva MR, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex based on amplification and sequencing of the oxyR pseudogene from stored Ziehl-Neelsen-stained sputum smears in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 106(1):9-15.

14. Steingart KR, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. PLoS Med. 2007; 4(6):e202.

15. Campelo C, et al. Tuberculose-diagnóstico laboratorial-baciloscopia. Série Telelab. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.

16. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga (org). Manual de bacteriologia da tuberculose. 2 ed. Rio de Janeiro. 1994; 240 p.

17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde, Programas Estaduais de Controle da Tuberculose. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Brasília: Bol Epidemiol. 2014; 44:1-13.

18. Koneman E, et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Biochemical test of identification of medical bacteria, 1997. Philadelphia, USA: Lippincott, 11-Yean, FM; 2000.

19. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 56(2):103-11.

20. Drobneiwski F, et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. Health Technol Assess; 2015.

21. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull World Health Organ. 1974; 51(1):71-82.

22. Rivas C, et al. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. Rev Argent Microbiol. 2010; 42(2):87-90.

23. López LM, et al. Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Infectio. 2011; 5(4).

24. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, Brasília. 2011; 248 p.

25. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância a Saúde. Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como problema de Saúde Pública no Brasil. Brasilia: Bol Epidemiol. 2017; 44:1-11.

26. Petroff, SA. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and faces. J Exp Med. 2015; 21(1):38-42.

27. Darzins E. The bacteriology of tuberculosis. University of Minnesota Press; 1958.

28. Leite G. Research on tuberculosis: 75 years of IBIT contributions. Braz J Infect Dis. 2013; 17(2):205-10.

29. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias, Brasília. 2008; 436 p.

30. Oliveira MSC, Lima CAM, Moura MMF. Análise do método Ogawa-Kudoh e comparação com o método Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein-Jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. Rev Pesq Criação; 2011.